

ミオシンの性状に及ぼす加圧の影響

—— ミオシンのプロテアーゼ感受性ならびにゲルの性質 ——

岩 崎 智 仁・山 本 克 博

Effect of High Hydrostatic Pressure on Rabbit Skeletal Myosin: Changes in Proteolytic Sensitivity and Characteristics of Pressure-induced Gel

Tomohito IWASAKI and Katsuhiro YAMAMOTO

(June 1998)

緒 言

筋肉の主要なタンパク質であるミオシンは低塩濃度下では自己集合しフィラメントとして、また高塩度下ではモノマーとして存在し、いずれも加熱によってゲル化するが、それらのゲル化機構は異なっている。ミオシンモノマーを加熱すると、ミオシンの頭部の遊離 SH 基による S-S 結合の形成やその他の非共有結合の形成により頭部が会合し、さらにミオシン尾部の coiled-coil がほどけてランダムコイルとなり¹⁾、aggregate タイプ²⁾のネットワーク構造を呈したゲルとなる。一方、ミオシンフィラメントは、加熱することでフィラメント表面から突出したミオシン頭部を介してのフィラメント同士の側面会合ならびに交差的な会合により strand タイプのゲルが形成される^{2,3)}。

ところで、フィラメント状態のミオシンは熱だけでなく圧力によってもゲルを生じることが Yamamoto ら⁴⁾によって明らかにされ、加圧によって形成されるゲルは、ミオシンフィラメントの加熱ゲルと同様、フィラメントの表面に存在するミオシン頭部のフィラメント間での側面ならびに交差的な会合によってゲル化すると考えられている。一方、モノマーのミオシンは加圧によってゲル化せず、頭部同士が会合し、尾部が放射状に拡がった形態をもった凝集体に留まる^{5,6)}。しかし最近、我々は加圧後のミオシン溶液を 0.1 M NaCl または KCl に対して透析して塩濃度を徐々に低下させることによってゲル（以下、透析ゲルと称す）が形成されることを見いだした。本研究は、ミオシンフィラメント由来の加熱ゲルと加圧ゲル、ならびにミオシンモノマー由来の透析ゲルの性質の違いを明らかにし、透析ゲルのゲル

化機構を解明することを目的とした。

実験材料ならびに方法

ミオシンの調製

ミオシンは、屠殺直後の家兎骨格筋から Offer らの方法⁷⁾に基づき調製した。得られた精製ミオシンは、55%飽和硫酸沈澱として使用時まで 4℃で保存した。

rod の調製

ミオシン尾部 (rod) は Margossian と Lowey の方法⁸⁾に基づいて調製し、Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。得られた rod は 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mg/ml に調整して実験に供した。

タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は紫外外部吸収によって行った。すなわち 280 nm および 320 nm での吸光度を測定し、 $(A_{280} - 1.5 \times A_{320})$ を正味の吸光度とした。用いた吸光係数は粗ミオシンが 0.543, 精製ミオシンが 0.52, rod が 0.22 である。

ゲルの作成

ミオシンを 0.1 M NaCl, 10 mM K phosphate (pH 6.0) に 5 mg/ml の濃度で懸濁させ、40~90℃で 15 分間加熱して加熱ゲルを作成した。加圧ゲルは、100~500 MPa で 15 分間加圧処理を行い作成した。透析ゲルは、0.5 M NaCl, 10 mM K phosphate (pH 6.0), 5 mg/ml に調整したミオシン溶液を 100~500 MPa で 15 分間加圧処理した後、0.1 M NaCl, 20 mM K phosphate (pH 6.0) に対して透析して作成した。

ゲルのプロテアーゼ消化性

ゲルに pH 2.0 に合わせた 0.1 M NaCl を最終の

タンパク質濃度が2.0 mg/mlになるように加えて超音波処理によって均質化し、さらにペプシンを1/600 (w/w) 加えて37℃で10分間処理した。反応混液に等量の10%トリクロロ酢酸 (TCA) を加えて反応を停止させ、遠心分離 (2,000×g, 10分間) して未消化のタンパク質を沈澱させ、上清部の280 nmでの吸光度を測定して消化性とした。

溶解性

ゲルを最終的に0.5 M NaCl (pH 7.0), 1 mg/ml となるように調整して一晩放置した後に、不溶性部分を遠心分離 (45,000×g, 30分間) で取り除き、上清部の280 nmでの吸収を測定し溶解性とした。

溶解したゲルの濁度

加圧ならびに透析ゲルを透析チューブに入れ、0.3~0.5 M NaCl, 20 mM K phosphate (pH 6.0) の溶液に対して透析して溶解させ、遠心分離 (45,000×g, 30分間) の前後での濁度を350 nmでの吸光度として測定した。

ゲルの構造観察

加熱、加圧、ならびに透析ゲルを1~2 mm 角に切り、固定、脱水、凍結乾燥を行った後に、Pt-Pb 蒸着を行い、走査型電子顕微鏡でゲル構造の観察を行った。

キモトリプシンによるミオシン尾部 (rod) の加圧下での加水分解

rod 溶液にキモトリプシンを重量比で1/200 となるように加えて、所定の圧力 (0.1~500 MPa) で10分間保持し、圧力解放後、直ちに反応溶液の1/200 量

の0.1 M PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えて反応を停止させた。

圧力処理後の rod フィラメントの形態観察

rod フィラメントの形態観察は Yamamoto の方法⁹⁾ に準じて行った。

結 果

ミオシンフィラメントの加熱ゲルと加圧ゲル、ならびにミオシンモノマーを加圧処理してから低塩濃度溶液 (0.1 M NaCl, pH 6.0) に透析することで形成された透析ゲルのペプシンによる消化性の結果を Fig. 1 に示した。加熱ゲルでは加熱時の温度が上昇するにつれて消化性は低下し、90℃の加熱で形成したゲルの消化性は40℃での値の約60%であった。加圧ゲルも圧力の増加に伴い消化性は低下したが、加熱ゲルの場合と比較すると低下の度合は小さく、500 MPa の加圧処理をした試料の消化性の低下は約25%であった。透析ゲルの消化性も圧力の増加に伴って低下し、低下の程度は加圧ゲルの場合と同様であった。

三種類のゲルの0.5 M NaCl (pH 7.0) に対する溶解性を Fig. 2 に示した。加熱ゲルでは、40~60℃にかけて溶解性が急激に低下し、70~90℃ではほとんど溶解しなかった。加圧ゲルは、200 MPa までは高い溶解性を示したが、200~300 MPa の範囲で急激に低下し、300~500 MPa の圧力処理によって形成されたゲルの溶解性は低かった。しかし、70~90℃の加熱によるゲルに比べると溶解性は若干高い値を示した。加熱ゲルと加圧ゲルはいずれも逆シグモイ

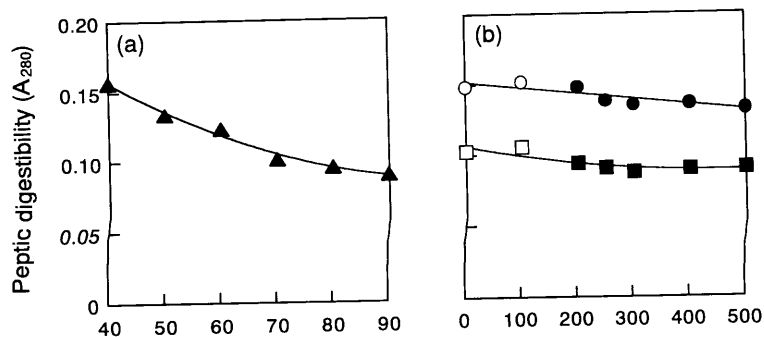


Fig. 1 Peptic digestibility of heat-induced (Δ), pressure-induced (\circ), and pressure-dialysis-induced gels (\square). Myosin in 0.1 M NaCl was heated at 40~90℃ for 15 min. Myosin in 0.5 M NaCl was pressurized at 100~500 MPa for 15 min. Pressurized myosin was dialyzed against 0.1 M NaCl and 20 mM K phosphate (pH 6.0). Gels were digested by pepsin (1/600, w/w) at 37℃ for 10 min, and the digestion was stopped by addition of an equal volume of 10% TCA. After centrifugation at 2,000×g for 10 min, absorbance of the supernatant was measured at 280 nm. Open symbols indicate myosin not gelled, and closed symbols indicate gelled myosin.

ド状の変化を示したのに対して、透析ゲルは、0.1~500 MPaにわたって溶解性はほとんど変化せず、500 MPaの圧力処理を行った試料の溶解性は未処理のものと変わらなかった。

どの程度の圧力で処理したミオシンから透析ゲルが形成されるかを知るために、70~210 MPaの各圧力で加圧処理した後のミオシンの透析後の形状を観察し、Table 1に示した。70 MPaで処理したミオシンモノマーは、0.1 M KClに対して透析しても無加圧の時と同じようなフィラメントを形成し（データ未掲載）、これを加熱処理（65℃、15分間）するとゲルを形成した。一方、140ならびに210 MPaで圧力処理したミオシンモノマーは、0.1 M KClに対して透析することでゲルを形成し、さらに、このゲルを65℃で15分間加熱すると離水（シネリシス）を起こした。

次に三種類のゲルの構造を観察した（Fig. 3）。加熱あるいは加圧ゲルでは、比較的均一で細かな3次元的なネットワーク構造が観察された（Fig. 3 a, b）。透析ゲルの構造は、加熱あるいは加圧ゲルに比べると粗雑で、不均一な構造を呈していた（Fig. 3 c）。また、物性値を測定したわけではないが、透析ゲルは他の2つのゲルよりも軟らかかった。

140 MPa以上で圧力処理したミオシンから形成された透析ゲルを加熱するとシネリシスを起したが、このシネリシスを起こしたゲルの構造を Fig. 4に示した。250 MPaで加圧したミオシンの透析ゲルの構造（Fig. 4 a）は、500 MPaでの加圧後の透析ゲル（Fig. 4 b）に比べて不均一なネットワークを呈していた。このようなゲル構造の違いが、250 MPaで加圧した時の透析ゲルの方が500 MPaでのものよりも軟らかいことの原因の一つと考えられた。一方、シネリシスを起こしたゲルの構造（Fig. 4 c, d）は、加圧時の圧力に関係なく、ネットワークの網目が切断したと思われる構造であった。

加圧によって誘起されるゲルが不可逆の変性によるものかあるいは可逆的なものかを知るために、形成されたゲルを0.3~0.5 M NaClに対して透析することで可溶化の程度を調べた。透析終了後の試料の濁度を測定し、さらに遠心分離（45,000×g、30分間）して得られた上清部の濁度を測定した。なお、この遠心分離条件ではミオシンモノマーを加圧（500 MPa、15分間）した際に形成されるミオシンのオリゴマーは沈澱しないことをあらかじめ確認した。加圧ゲルを0.3 M NaClに対して透析した場合、300 MPa以上の圧力処理で形成されたゲルは可溶化の

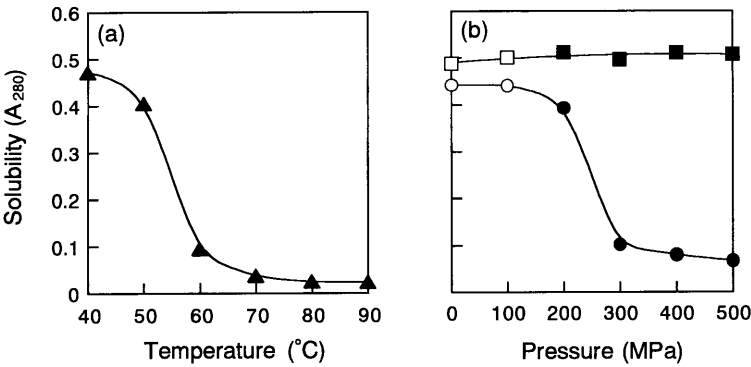


Fig. 2 Solubility of heat-induced (Δ), pressure-induced (○), and pressure-dialysis-induced gels (□). Gels were sonicated in 0.5 M NaCl and left overnight. After centrifugation (20,000×g, 30 min), absorbance of the supernatant was measured at 280 nm.

Table 1 The state of pressurized myosin after various treatments.

Myosin	Pressure (MPa)		
	70	140	210
Dialyzed at 0.1 M NaCl (pH 6.0)	filament	gel	gel
Dialyzed, then heated (60℃, 15 min)	gel	syneresis	syneresis

Myosin in 0.5 M NaCl and 10 mM K phosphate (pH 6.0) was pressurized at 70-210 MPa for 15 min, then dialyzed against 0.1 M NaCl and 20 mM K phosphate (pH 6.0) and heated at 60℃ for 15 min.

程度が低く、濁度の測定はできなかった。遠心分離後の上清部の画分の濁度は、無加圧 (0.1 MPa) の時が一番高く、圧力の増加と共に濁度は減少し、250~500 MPa ではほぼ 0 になった (Fig. 5 a)。0.4 M NaCl に対して透析した場合では、250 MPa から濁度は急激に増加し、400 MPa で最大となった。遠心分離後の濁度は遠心分離前に比べて全体的に低く、250 MPa から濁度が高くなり始めて 300 MPa で最大値を示し、それ以上の圧力では減少し、500 MPa では 0 に近い値となった (Fig. 5 b)。0.5 M NaCl では、濁度は遠心分離の前後ともに、250 MPa から濁

度の増加が確認できたが、遠心分離後の濁度の方が全体的に低かった (Fig. 5 c)。

透析ゲルを 0.3 M NaCl に透析した場合、加圧時の圧力が高くなるにつれて、濁度が非常に高くなった。遠心分離後の濁度は全体的に低くなり、500 MPa での値は遠心分離前の約 20% となった (Fig. 6 a)。0.4 M および 0.5 M NaCl では、遠心分離の前後の濁度にほとんど差はなかった (Fig. 6 b, c)。

次に、0.5 M NaCl に溶解させた後の透析ゲルの可溶化画分でのミオシンの形態を調べた。無加圧のミオシンは、2つの頭部と長い尾部からなる形態を

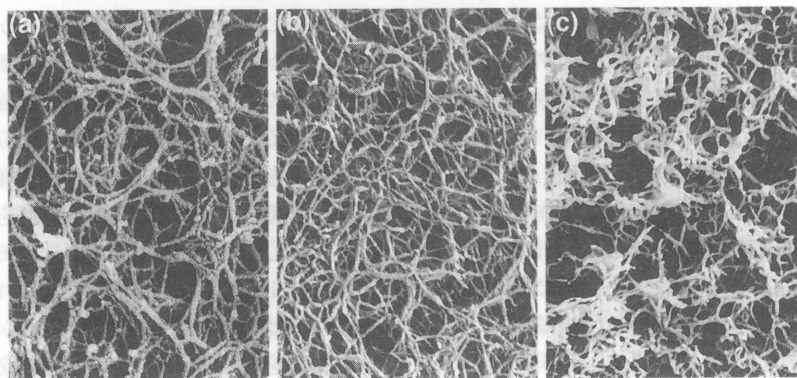


Fig. 3 Microstructures of heat-induced, pressure-induced, and pressure-dialysis-induced gels. (a), myosin heated in 0.1 M NaCl (pH 6.0) at 65°C for 15 min; (b), myosin pressurized in 0.1 M NaCl (pH 6.0) at 200 MPa for 15 min; (c), myosin pressurized in 0.5 M NaCl, then dialyzed against 0.1 M NaCl (pH 6.0). The protein concentration was 5 mg/ml.

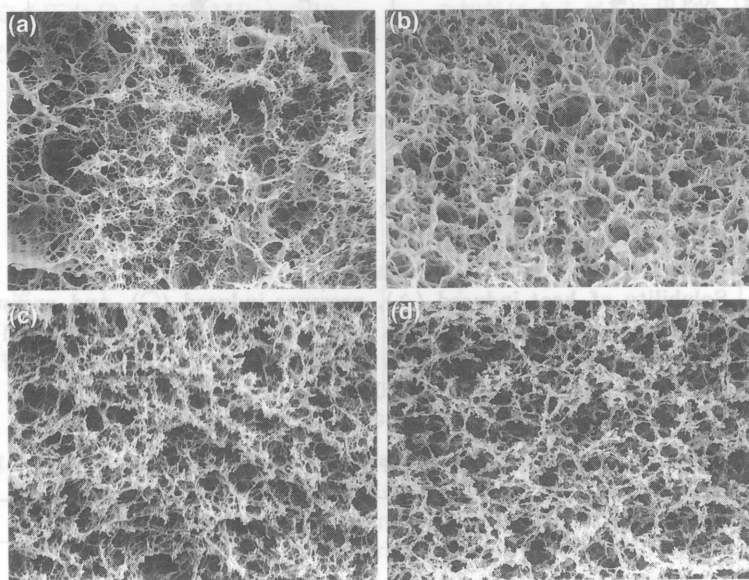


Fig. 4 Microstructures of pressure-dialysis-induced gel and their heat induced collapsed gel. Myosin in 0.5 M NaCl (pH 6.0) was pressurized at 250 MPa (a) and 500 MPa (b), then dialyzed against 0.1 M NaCl (pH 6.0). (c), heat-treated gel of (a); and (d), heat-treated gel of (b).

呈した (Fig. 7 a)。加圧後の試料ではミオシンモノマーの頭部同士がいくつも会合し、尾部が放射状に広がったディジーホイール状のオリゴマーが観察で

きた (Fig. 7 b)。加圧 (500 MPa, 15 分間) 後のミオシンオリゴマーを透析によって NaCl 濃度を 0.1 M に下げてゲルを形成させたものを、再び 0.5 M

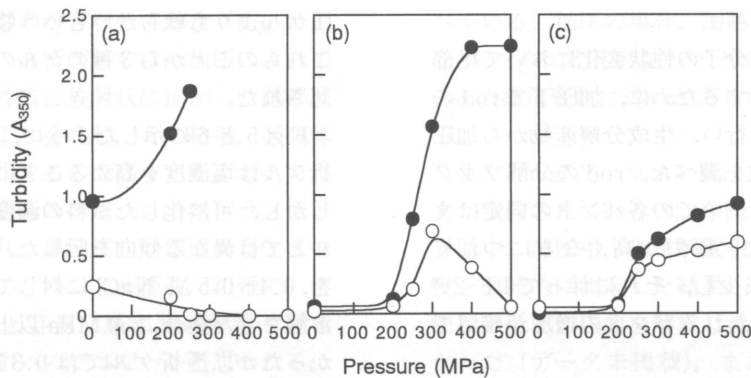


Fig. 5 Turbidity of solubilized fraction of pressure-induced gel before (closed) and after (open) centrifugation. Centrifugation was done at $45,000\times g$ for 30 min. (a), 0.3 M; (b), 0.4 M; (c), 0.5 M NaCl.

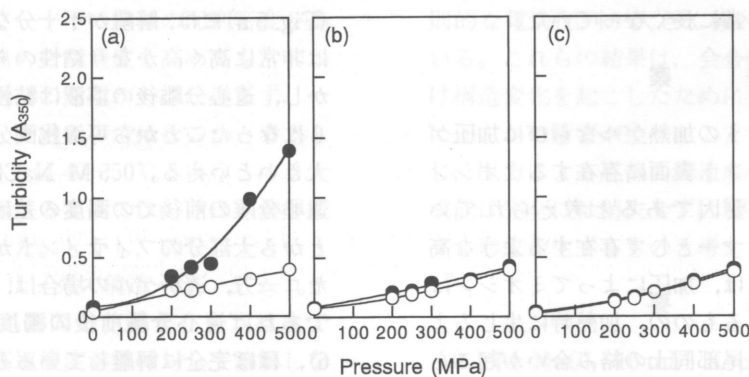


Fig. 6 Turbidity of solubilized fraction of pressure-dialysis-induced gel before (closed) and after (open) centrifugation. Centrifugation was done at $45,000\times g$ for 30 min. (a), 0.3 M; (b), 0.4 M; (c), 0.5 M NaCl.

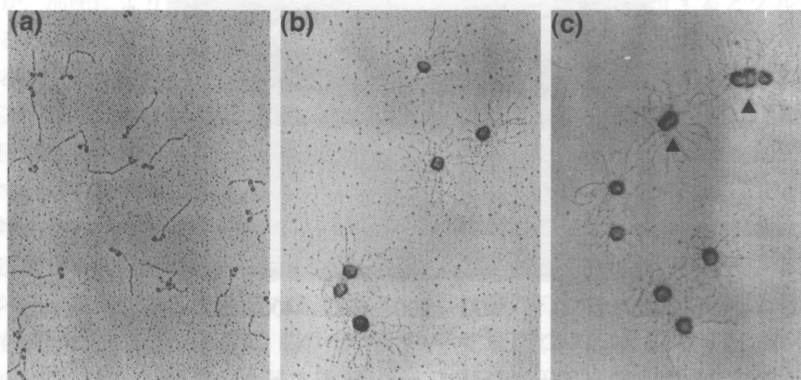


Fig. 7 Transmission electron micrographs of solubilized fraction from pressure-dialysis-induced gel after dialysis against 0.5 M NaCl. (a), control myosin; (b), pressurized myosin at 500 MPa for 15 min; (c), solubilized fraction of pressure-dialysis-induced gel. Arrowhead indicates connected oligomer.

NaCl に対して透析を行って溶解させた時のミオシンの形態は、加圧直後のミオシンで観察できたデージーホイール状のもの他にこれらの凝集体が2つあるいは3つ連結しているものが確認された (Fig. 7c, 矢印)。

加圧によるミオシン分子の性状変化において尾部の変化をより明らかにするために、加圧下で rod のキモトリプシン消化を行い、生成分解産物から加圧下での rod の構造変化を調べた。rod の分解フラグメントの電気泳動パターンでの各バンドの同定は文献¹⁰⁾に基づいて行った。圧力が高くなるにつれて rod 自体のバンドは減少し、それに伴って LF-2¹⁰⁾ (鎖量約 47 kDa) と思われるバンドの増加が確認できた (Fig. 8)。

加圧後の rod フィラメントの形態観察の結果を Fig. 9 に示した。pH 6.0 での rod フィラメントは、100 MPa までは大きな変化はなかったが、200 MPa 以上の圧力処理では細く針状のフィラメントが側面同士で連結し、かつ非常に長くなっていた。

考 察

ミオシンフィラメントの加熱ゲルならびに加圧ゲルの形成にはフィラメント表面に存在するミオシン分子頭部の会合が主要因であると考えられている^{3,4)}。ミオシンがモノマーとして存在するような高塩濃度条件下においては、加圧によってミオシンは頭部同士の会合が起こるものの、加熱時に生じるような尾部の変性による尾部同士の絡み合いが起こらないためにゲル化には至らない⁵⁾。しかし、本研究で示したように、モノマー状態のミオシンを一旦加圧

した後に、透析によって徐々に塩濃度を 0.1 M にまで低下されることで、ゲルが形成されることが明らかになった。また、ミオシンフィラメントの加圧ゲルは加熱ゲルよりも軟らかく、さらに透析ゲルは加圧ゲルよりも軟らかいという物性的な違いもあり、これらのことから3種のゲルの形成機構の違いが予想された。

Fig. 5 と 6 に示したように、加圧ゲルならびに透析ゲルは塩濃度を高めることによって可溶化した。しかし、可溶化した試料の濁度は加圧ゲルと透析ゲルとは異なる傾向を示した。すなわち、加圧ゲルを、0.4~0.5 M NaCl に対して透析を行ってゲルを溶解させた場合、250 MPa 以上では濁度が非常に高かったが、透析ゲルでは 0.3 M NaCl の場合を除き、コントロールと同様の濁度上昇の傾向を示した (Fig. 6)。また、透析ゲルの濁度変化はほぼ一次直線的であったのに対し、加圧ゲルの変化はシグモイド型であった。加圧ゲルでは、0.3 M NaCl のとき (Fig. 5 a) には、解離が不十分なために遠心前の濁度は非常に高く、かなり粘性のある溶液であった。しかし、遠心分離後の溶液は粘性が低く、濁度がほぼ 0 になったことから可溶化画分中の凝集体は非常に大きいといえる。0.5 M NaCl の時 (Fig. 5 c) には、遠心分離の前後での濁度の差は小さくなり、このことから大部分のフィラメントが解離したと考えられた。一方、透析ゲルの場合は、0.4 M 以上の塩濃度であれば遠心分離前後の濁度に差異はなく (Fig. 6)、ほぼ完全に解離していると考えられる。以上のような結果から、ミオシンの尾部は加圧処理ではフィラメント形成能を失うことなく、ほぼインタク

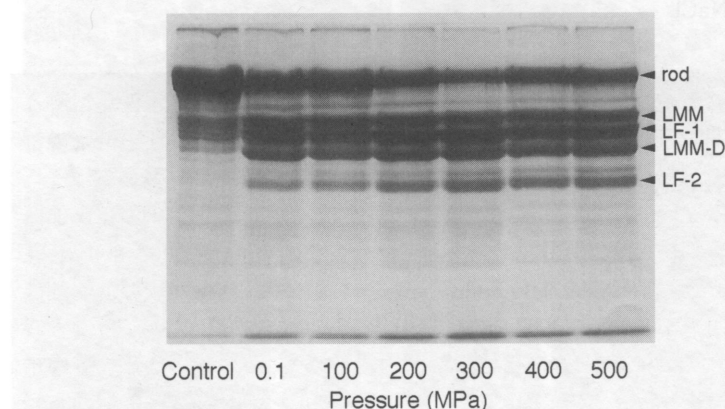


Fig. 8 SDS-PAGE of chymotryptic myosin rod in 0.5 M NaCl under pressure. Myosin rod in 0.5 M NaCl and 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) was digested with chymotrypsin for 10 min under pressure. The ratio of myosin : chymotrypsin was 200 : 1 by weight. As soon as pressure was released, the reaction was terminated by the addition of PMSF. SDS-PAGE was done according to the method of Laemmli¹⁷⁾.

トな状態のままではないかと思われた。また、透析ゲルを 0.5 M NaCl に対して透析してゲルを溶解させた後の可溶化画分のミオシンの形態を観察したところ、ミオシンの頭部同士が凝集したオリゴマーが 2, 3 個連結したものが存在していた (Fig. 7)。このような結果から、透析ゲルでは、加圧によって誘導された凝集体の外側に放射状に拡がった尾部同士が塩濃度の低下により会合し、その結果、凝集体同士が連結してゲル化するのではないかと考えられた。この時の尾部の会合はミオシンのフィラメント形成の場合とは異なり、規則正しい側面会合とはならないであろう。そのためにゲル構造が粗雑で、溶媒の塩濃度を高めると容易に尾部間の解離が起こり、ゲルが溶解しやすいのではないと思われる。一方、ミオシンフィラメントから形成される加圧ゲルではゲルの網目を構成している線維は、複数のフィラメントが側面会合した束から成っており、この中での尾部は規則的な配置をとり、透析ゲルの場合よりもゲルネットワークでの尾部の配列密度が高いと思われる。このために塩濃度を高めても、ゲルのネットワークでの尾部の解離が一様に進まず、一部は大きな集合体として残るのではないかと考えられた。加熱ゲルにおいては 40~50℃ というミオシン頭部間の凝集反応が起こる温度では、さほど溶解度の低下は見られなかった。しかし、60℃ 以上というミオシン尾部の α -ヘリックス構造 \rightarrow ランダムコイル構造転移が起こり尾部同士が絡まり合う温度では、ゲルがほとんど高塩濃度溶液に対して溶解しなくなった (Fig. 2)。このことはフィラメント軸を構成している rod が熱変性により不溶化したことを示している。

ミオシンはキモトリプシンによって切断される部位が決まっている¹¹⁾が、加圧により尾部の構造に変化が生じれば生成する分解フラグメントに違いが生じることが予想される。加圧下での rod のキモトリプシン処理試料の SDS-PAGE パターン (Fig. 8) は分解産物の種類には圧力による違いはないものの圧力が高くなるにつれて rod の分解が促進され、それに伴う低分子成分の増加があった。上野ら¹²⁻¹⁴⁾は、タンパク質の高次構造変化を同定する酵素プローブ法を用いて、ミオシン rod ならびに S-2 部位の構造に対する温度の影響を調べた。これによると、プロテアーゼによる rod の切断領域が、温度の上昇に伴って LMM/S-2 のつなぎ目 (ヒンジ領域) から S-2 の内部に広がっていくため、電気泳動でのバンドパターンが、低温 (20℃ 以下) では LMM と S-2 に相当するバンドが明確であるが、高温になるにつれて、

S-2 部分から由来するバンドがより多くの箇所で切断されるために不明瞭になるとし、ミオシン尾部の α -ヘリックス構造が 25℃ 近くで局所的高次構造転移 (ヘリックス \rightarrow コイル転移) を起こしていると述べている。加圧の場合、加熱で見られるような新たなバンドの出現がないことから、圧力と熱とは rod の構造変化に違いがあるのではないかと思われる。

また、rod フィラメントは加圧により解離することが報告されており¹⁵⁾、今回の rod フィラメントの昇圧中、加圧中、加圧解放中、解放後の 4 段階の濁度を連続的に測定した結果、濁度は昇圧ならびに加圧中に低下し圧力を解放しても元の濁度には戻らなかった (データ未掲載)。また、圧力解放後の rod フィラメントの形態は細く短くなり、それらが側面会合により連結して長くなっていた (Fig. 9)。フィラメント形成を誘起する部位は尾部の C 末端側に局在し、その形成には、会合部位のアミノ酸残基の規則的な電荷配列が大きく係わっている¹⁶⁾とされている。これらの結果は、会合部位が圧力の影響を受け構造変化を起こしたために、フィラメント形成能に何らかの障害が生じたことを示唆している。しかし、圧力による尾部の構造変化ではフィラメント形成能は完全には消失せず、尾部間の相互作用によるゲル形成が生ずるものと考えられた。

要 約

0.1 M NaCl, 10 mM K phosphate (pH 6.0), 5 mg/ml に調製したミオシンフィラメントは、加熱あるいは加圧するとゲル化した。また、0.5 M NaCl, 10 mM K phosphate (pH 6.0), 5 mg/ml に調製したミオシン溶液を加圧処理した後、0.1 M NaCl に対して透析するとゲルを形成した。これら三種類のゲルの消化性、溶解性ならびにゲルの構造を観察した。消化性の低下の割合は加熱ゲルが最も大きく、加圧ゲルならびに透析ゲルはそれよりも小さかった。加熱ゲルおよび加圧ゲルの溶解性はそれぞれ 50~60℃, 200~300 MPa で著しく低下したのに対して、透析ゲルの溶解性は 0.1~500 MPa の圧力範囲内で変化しなかった。また、透析ゲルの構造は他の二つのゲルに比べると粗雑で、不均一な網目を呈していた。0.3~0.5 M NaCl に対して透析した後の加圧ゲルの溶解画分の濁度は、圧力の増大と共にシグモイド型の増加傾向を示したのに対して、透析ゲルのそれは一次直線的な増加であった。透析ゲルの溶解後のミオシンの形態を観察した結果、加圧によって形成されたオリゴマーが 2, 3 個連結した

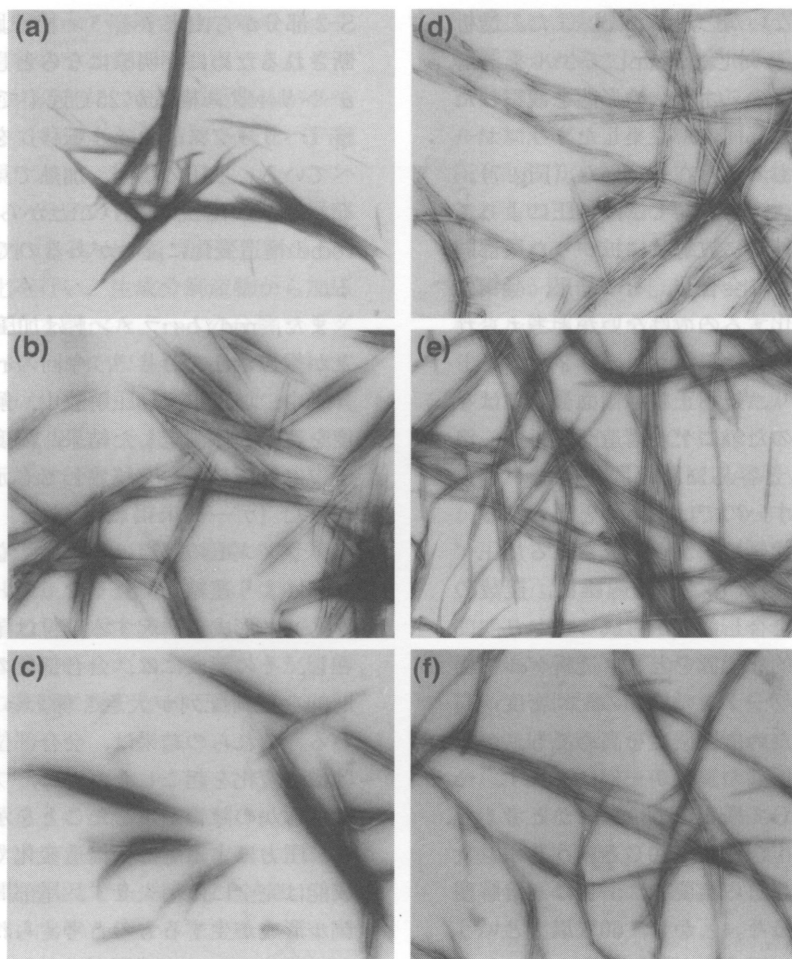


Fig. 9 Transmission electron micrographs of rod filament at pH 6.0 after pressure treatment. (a), control rod filament; rod filaments pressurized at 50 MPa (b); 100 MPa (c); 200 MPa (d); 300 MPa (e); and 400 MPa (f).

凝集体が確認できた。

加圧によるミオシン尾部の性状変化を明らかにするために加圧下でrodのキモトリプシン消化を行いSDS-PAGEで分析した結果、圧力の増加に伴ってrod自体のバンドが減少し、鎖量約47 kDaのバンドの増加があった。また加圧処理した後のrodフィラメントを観察すると、200 MPa以上の圧力処理後ではフィラメントが細く長くなっていた。

これらの結果から、ミオシンの尾部は、加圧によってその構造に変化が生じているものの自己集合能を失っておらず、加圧後のミオシンオリゴマーの尾部同士が連結してゲルが形成されたと考えられた。

参考文献

- 1) 安井勉, 鮫島邦彦, 1985. 筋肉タンパク質の加熱ゲル形成. *New Food Industry*, 27: 81-88.
- 2) Hermansson, A-M., O. Harbitz, and M. Langton, 1986. Formation of two types of gels from bovine myosin. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 69-84.
- 3) Yamamoto, K., K. Samejima, and T. Yasui, 1988. Heat-induced gelation of myosin filaments. *Agric. Biol. Chem.*, 52: 1803-1811.
- 4) Yamamoto, K., T. Miura, and T. Yasui, 1990. Gelation of myosin filament under high hydrostatic pressure. *Food Structure*, 9: 269-277.
- 5) Yamamoto, K., S. Hayashi, and T. Yasui, 1993. Hydrostatic pressure-induced aggregation of myosin molecules in 0.5 M KCl at pH 6.0. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 383-389.
- 6) Yamamoto, K., Y. Yoshida, J. Morita, and T. Yasui, 1994. Morphological and physico-

chemical changes in the myosin molecules induced by hydrostatic pressure. *J. Biochem.*, 116: 215-220.

- 7) Offer, G., C. Moos, and R. Starr, 1973. A new protein of thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. *J. Mol. Biol.*, 74: 653-676
- 8) Margossian, S.S. and S. Lowey, 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods in Enzymology*, 85: 55-71.
- 9) Yamamoto, K., 1988. Effect of H-protein on the formation of myosin filaments and light meromyosin paracrystals. *J. Biochem.*, 103: 274-280.
- 10) Nyitrai, L., G. Mocz, L. Szilagyi, and M. Balint, 1983. The proteolytic substructure of light meromyosin. *J. Biol. Chem.*, 258: 13213-13220.
- 11) Weeds, A.G. and B. Pope, 1977. Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effect of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.*, 111: 129-157.
- 12) 上野均, 1984. 蛋白質の高次構造変化を同定する酵素プローブ法. 蛋白質核酸酵素, 29: 1477-1485.
- 13) Ueno, H. and W.F. Harrington, 1986. Temperature-dependence of local melting in the myosin subfragment-2 region of the rigor cross-bridge. *J. Mol. Biol.*, 190: 59-68.
- 14) Ueno, H. and W.F. Harrington, 1986. Local melting in the subfragment-2 region of myosin in activated muscle and its correlation with contractile force. *J. Mol. Biol.*, 190: 69-82.
- 15) King, L., C.C. Liu, and R-F. Lee, 1994. Pressure effects and thermal stability of myosin rods and rod minifilaments: Fluorescence and circular dichroism studies. *Biochemistry*, 33: 5570-5580
- 16) Sohn, R.L., K.L. Vikstrom, M. Strauss, C. Cohen, A.G. Szent-Györgyi, and L.A. Leinwand, 1997. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J. Mol. Biol.*, 266: 317-330.
- 17) Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Summary

Heat-induced and pressure-induced gels were prepared from rabbit skeletal myosin filaments in 0.1 M NaCl and 10 mM K phosphate (pH 6.0). The pressurized monomeric myosin in 0.5 M NaCl, which was not a gel, formed a gel by subsequent dialysis against 0.1 M NaCl at pH 6.0. We call it pressure-dialysis-induced gel. Solubility of heat-induced and pressure-induced myosin filament gels decreased with elevating temperature or pressure. On the other hand, that of pressure-dialysis-induced gel was not changed from 0.1 MPa to 500 MPa. Both heat- and pressure-induced myosin filament gels had a fine network structure, whereas the network of pressure-dialysis-induced gel was loose. Turbidity of the solubilized fraction of the gels dialyzed against 0.5 M NaCl was measured before and after centrifugation ($45,000 \times g$, 30 min). Turbidity of the pressure-induced gel increased sigmoidally with elevating pressure, whereas that of pressure-dialysis-induced gel increased linearly. Electron microscopic observation of solubilized fraction from pressure-dialysis-induced gel disclosed the presence of connected oligomeric species containing two or three clumps. This result suggests that the dialysis-induced gelation of pressurized monomeric myosin is due to tail-to-tail interaction among aggregated myosins.

To study the effect of pressure on the myosin rod, we conducted proteolytic digestion of rod under pressure and examined the morphology of the rod filament. Chymotryptic rod fragments analyzed by SDS-PAGE were essentially the same in the control and the pressurized samples, but increase of the 47 kDa band and concomitant decrease of the rod band were observed in the pressurized rod. Moreover, rod filaments after pressure treatment (>200 MPa) were thin and long.

These results suggest that pressure-dialysis-induced gel is formed through tail-to-tail interaction by gradual decreases in salt concentration, although slight conformational changes in the rod takes place by pressurization.